

¿QUE ES ESO DE LA HISTOCOMPATIBILIDAD?

Luis González Salas*

RESUMEN

Se discute en este trabajo algunos de los aspectos más relevantes de las pruebas de histocompatibilidad y su relación con la inmunología de los trasplantes de órganos y tejidos.

Se presentan consideraciones teóricas generales sobre los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, su participación en la respuesta inmune y los procedimientos de laboratorio tradicionales y más novedosos para su estudio y aplicación en la actualidad.

Igualmente, se revisa en forma general el impacto de estos estudios en el éxito de los programas de trasplantes, que se han convertido en un arma terapéutica muy valiosa en diversas patologías a nivel mundial y, por supuesto, también en Costa Rica. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1994; 15(1,2): 57-62).

INTRODUCCION

Los trasplantes de órganos y tejidos dejaron, hace bastantes años, de ser considerados como "procedimientos experimentales", para constituirse en armas terapéuticas eficaces para el abordaje de patologías de muy diverso origen, desde la insuficiencia renal crónica terminal, hasta la diabetes y ciertas neoplasias malignas. El avance en este campo ha sido, sin duda, la consecuencia de los progresos logrados a nivel mundial, entre otros, en los métodos

quirúrgicos, en las terapias inmunosupresoras y en el conocimiento de los fenómenos inmunológicos involucrados (1, 2, 3, 4).

Los trasplantes en personas genéticamente dispares son, en gran parte, rechazados como consecuencia de la barrera impuesta por aloantígenos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (2, 5, 6, 7, 8). La participación de otras moléculas en estos fenómenos, en particular las del denominado complejo menor de histocompatibilidad (CmH) podría guardar gran relevancia; sin embargo, se deberá esperar algún tiempo para pensar en su aplicación clínica inmediata (2, 9, 10).

¿QUE ES EL HLA?

En los seres humanos, el CMH (llamado HLA, Human Leucocyte Antigens) es un sistema de genes que ocupa $3,5 \times 10^6$ pares de bases de DNA en el brazo corto del cromosoma 6 y codifica la síntesis de una gran cantidad de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos y, por tanto, en los mecanismos fundamentales de reconocimiento del sistema inmune, incluyendo el rechazo de trasplantes. (7, 11). El CMH es, por tanto, esencial en los procesos de defensa del organismo. Los marcadores de este sistema señalan sólo los antígenos a los cuales un individuo es capaz de responder, sino también qué tan fuertemente puede hacerlo. Estas moléculas, además, permiten a las células inmunes el reconocerse y comunicarse unas con otras.

Aunque muchos otros genes aparecen localizados en el complejo HLA, se

* Unidad de Inmunología y RIA. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA). Apdo # 4, Tres Ríos.

considera que no sólo los antígenos de las clases I y II guardan relevancia en lo referente a la inmunología de los trasplantes.

Sin duda, uno de los aspectos más relevantes de las moléculas HLA es su diversidad y polimorfismo; es decir, existen muchas series diferentes de antígenos HLA, cada una de las cuales tiene múltiples variantes alélicas o especificidades. El complejo se hereda de una forma mendeliana. El juego de genes portado por cada cromosoma se denomina *haplotipo*. Los loci que comprenden ese haplotipo se encuentran estrechamente ligados y se heredan como una unidad genética. Por tanto, cada individuo tendrá dos haplotipos HLA, uno proveniente de cada progenitor.

Puesto que el producto de cada gen HLA se expresa codominantemente, cada individuo expresa dos antígenos por locus. Se denomina *fenotipo* al conjunto de antígenos identificados en cada locus y *genotipo* al conjunto de genes en el cromosoma correspondiente a dichos antígenos (4).

Los antígenos clase I (HLA A, B y C), que se encuentran en todas las células nucleadas, están compuestos por una cadena pesada de 45 kd asociada no covalentemente con la beta 2 microglobulina. Estos antígenos son los marcadores de "lo propio" y alertan a los mecanismos citotóxicos sobre la presencia de células "alteradas" —infectadas por virus o transformadas malignamente— para poder eliminarlas. (12)

Los antígenos clase II (DR, DP y DQ) tienen una distribución tisular más limitada (macrófagos, células B y linfocitos T activados, principalmente). Son heterodímeros compuestos por una cadena alfa (PM 29-34 kd), covalentemente unida a una cadena beta de 25-28 kd. La función de estas moléculas es, primariamente, la activación de las células T, en particular linfocitos T cooperadores. Las moléculas

clase II, existentes en las células presentadoras de antígenos, interactúan con el antígeno para formar un complejo. Este complejo se une al receptor de las células T, una molécula similar a los antígenos del CMH y miembro también de la

familia de las inmunoglobulinas. De esta forma, se inicia y se mantiene la respuesta celular a antígenos extraños mediante la proliferación de linfocitos T y la secreción de diversos mediadores (12, 13).

Resulta importante resaltar el hecho que el rechazo de un injerto es un complejo proceso que depende de la interacción de muchos tipos de células y de innumerables mediadores solubles (6, 7). Ante el contacto con un tejido "ajeno", se inicia en el receptor una respuesta de linfocitos T específicos contra los antígenos de histocompatibilidad extraños del donador. Los linfocitos T cooperadores-inductores reconocen los antígenos HLA clase II extraños del donador y se activan para proliferar, diferenciarse y secretar un conjunto diverso de factores

solubles de crecimiento y diferenciación, denominados linfoquinas. Las linfoquinas inducen una mayor expresión de antígenos HLA clase II en los tejidos trasplantados, estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos contra determinantes antigénicos del injerto y ayudan a los linfocitos T a desarrollar las funciones efectoras, como la citotoxicidad usualmente específica para los antígenos HLA clase I, que culminan con el daño al tejido extraño.

No cabe duda que, como afirman algunos autores (6, 7), un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares del fenómeno de rechazo significa no sólo un importante avance en el campo de los trasplantes, sino que dará, como hasta ahora, nuevas luces respecto de otros problemas clínicos como el cáncer, las enfermedades infecciosas y las patologías autoinmunes.

¿COMO ESTUDIAN LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD?

El polimorfismo en las regiones clase I y clase II del CMH fue detectado inicialmente con técnicas serológicas, y ha sido confirmado luego mediante análisis de genes y secuencias utilizando diversas técnicas de genética molecular (análisis de fragmentos de restricción, secuencia de genes, mapeo de péptidos, reacción en

cadena de la polimerasa-PCR-y otras). Para el polimorfismo funcional, por su parte, se utilizan técnicas diversas como el cultivo mixto de linfocitos, el tipo de linfocitos "iniciados" (PLT, por sus siglas en inglés) y la linfocitotoxicidad mediada por células T (13).

Tradicionalmente, la clasificación de los antígenos HLA se ha realizado por métodos serológicos, utilizando técnicas de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento (los clase I) o técnicas celulares (cultivo mixto de linfocitos, para los clase II). La estandarización de estos procedimientos ha merecido la atención de reconocidas organizaciones en el mundo entero (13, 14).

A pesar de que su importancia relativa en cuanto al pronóstico del trasplante parece ser mayor, es un hecho reconocido a nivel mundial que resulta mucho más difícil la clasificación serológica de los antígenos DR que los de la clase I (A, B y C). Ello es una consecuencia de muchos factores, entre los que sobresalen la dificultad para la obtención de linfocitos B, la existencia de un número mayor de genes de lo esperado con base en la serología, la escasez de anticuerpos monoespecíficos adecuados, la expresión anormal de estos antígenos y la reactividad cruzada entre alelos DR (15, 16). Por ello, se han propuesto diversos métodos alternativos (17, 18, 19, 20, 21, 22) fundamentados en procedimientos de genética molecular, mediante el análisis directo de los genes (genotipificación HLA). De ellos, uno de los más precisos (23) hasta la fecha involucra la hibridación de sondas de oligonucleótidos secuencia-específicos (oligotipificación HLA), que identifica todos los alelos HLA clase II, incluyendo diferencias micropolimórficas. Incluso, cuando se lleva a cabo con muestras amplificadas con la técnica de la reacción de la polimerasa (PCR), la oligotipificación puede ser aplicada a todos los loci clase II (HLA DR, DO y DP). Más aún, recientemente (23) ha sido descrito un método semiautomatizado simple, que consiste en una prueba de hibridación de oligonucleótidos sobre placas de microtítulo

y seguido de una lectura colorimétrica. Así, la clasificación de las 30 especificidades DR (incluyendo los subtipos DR1, DR2, DR13, DR14 y DR52) puede completarse en menos de 4 horas. El procedimiento, que ya ha sido evaluado a nivel internacional en categorías prospectivas de candidatos a trasplante de riñón y médula ósea y sus posibles donantes, podría ser aplicado a pruebas genéticas en general, incluyendo a los pacientes con mutaciones múltiples.

De igual manera, otros grupos (21) han descrito métodos basados en las secuencias de los antígenos clase I, con los cuales no sólo es posible una clasificación altamente confiable de cualquier muestra, heterocigota u homocigota, sino derivar además información molecular importante para la identificación de secuencias alélicas conocidas o nuevas.

Por tanto, es de esperar, como efectivamente ha sucedido, que surjan día a día nuevas modificaciones a estos y otros procedimientos. El potencial derivado de los mismos permitirá, como hasta ahora, no sólo acelerar la obtención de resultados cada día más confiables, sino también ponerlos al servicio de otros grupos de pacientes, en los cuales, por diversas razones técnicas o de tiempo, las barreras impuestas por la histocompatibilidad en el HLA no habían podido ser superadas por los métodos convencionales. Ello ha incidido, según los reportes de los centros especializados (3, 4, 14, 15), en una mejoría en la supervivencia y mayores posibilidades para diversos grupos de pacientes, desde los enfermos crónicos de riñón a la espera de un órgano cadavérico, hasta los pacientes con ciertas neoplasias malignas sin un familiar adecuado y dispuesto para la donación.

IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Si bien ha existido alguna controversia, hoy día se considera prácticamente incuestionable la utilidad de la determinación de la variación genética en la

región HLA en muchos de los programas de trasplantes. Se estima que aún con la utilización de potentes drogas inmunosupresoras como la ciclosporina, la definición precisa de los antígenos HLA y su comparación entre donadores y receptores guarda una relación directa con la sobrevida de los injertos y de los pacientes e inversa con los eventos de rechazo y otros problemas asociados (1, 3, 4, 24, 25).

A pesar de que podrían citarse muchísimos más, algunos pocos ejemplos podrían ilustrar las bondades de estos estudios en los programas de trasplantes:

- a) El análisis de 14005 trasplantes de riñón, realizados en la Universidad de California en Los Angeles antes de 1977 (26), ha mostrado que el factor más importante que influyó la tasa de supervivencia a los 10 años fue el grado de histocompatibilidad entre el donador y el receptor: un 67% entre individuos idénticos contra un 20% en donadores cadavéricos, lo que equivale a 3,5 veces menos fracasos en los procedimientos. Aún con el advenimiento de la era de la ciclosporina, los resultados comparativos entre estos grupos, si bien no tan dramática, siguen mostrando una diferencia significativa en especial en la supervivencia a largo término.
- b) El análisis de la experiencia del prestigioso grupo Sloan-Kettering (4) en trasplantes de médula ósea, muestra un 43% de fracasos en el injerto en trasplantados con un haplotipo no idéntico en un antígeno, un 50% en casos de dos antígenos diferentes y 75% en casos con diferencias en tres antígenos, en comparación con 15% en donadores con los dos haplotipos idénticos. En relación con la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, fenómeno particular de rechazo que se presenta sólo en el trasplante de médula ósea), la frecuencia de 30-40% en trasplantes con donadores HLA idénticos, se incrementa a 73%

cuando hay diferencia en un locus y es mayor de 80% cuando la disparidad es en 2 ó 3 locus.

- c) El rechazo es un riesgo potencial también en el trasplante de páncreas (3). Las investigaciones demuestran que el mismo se reduce considerablemente con una buena compatibilidad en el HLA-DR entre el donador y el receptor. La compatibilidad en uno o los dos antígenos DR determina, por ejemplo, que la supervivencia a un año sea significativamente más alta que entre individuos histoincompatibles (58% versus 36% en un estudio); lo mismo es cierto para todos los casos recolectados en el Registro Internacional de Trasplantes 1984-1988 (27, 28).

La clasificación de antígenos HLA ha demostrado también, por otra parte, ser de utilidad en el análisis de la susceptibilidad genética a enfermedades autoinmunes, puesto que se ha asociado ciertos alelos específicos con enfermedades particulares, por ejemplo (HLA DR3 y DR4 con diabetes mellitus insulino-dependiente (29). Y como si esto fuera poco, el grado de polimorfismo de estos genes ha resultado también ser relevante para la identificación individual en análisis forenses, en determinaciones de paternidad ha dado paso a apasionantes estudios de genética molecular de poblaciones (30, 31).

En Costa Rica, el Laboratorio de Inmunología del INCIENSA, a pesar de múltiples limitaciones, realiza desde varios años los estudios de histocompatibilidad (clasificación de antígenos HLA por serología, cultivo mixto de linfocitos y pruebas cruzadas), para muchos de los trasplantes de riñón y médula ósea que se realizan en el país. Aprovechando la experiencia acumulada hasta la fecha, y respondiendo a las sugerencias de diferentes grupos y profesionales, se pretende ahora reforzar los procedimientos existentes e introducir otros nuevos, especialmente aquellos relacionados con

las nuevas tecnologías de genética molecular mencionadas, que se requieran para crear un centro de referencia en histocompatibilidad para el área. Este, aprovechando la colaboración con otros grupos relacionados en el país, buscaría desarrollar, en una forma más sistemática y amplia, todos los aspectos (diagnóstico, investigación, docencia) relacionados con esta rama de la inmunología en la cual se fundamenta parte del éxito de muchos de los programas de trasplantes, que benefician día a día a un número mayor de personas en Costa Rica y en el mundo entero.

ABSTRACT

In this paper, some of the most relevant aspects on histocompatibility testing and its relation with tissue and organ transplant immunology are discussed.

Technical considerations relates to the major histocompatibility complex, its participation in the immune response and available laboratory procedures are also presented.

Finally, the impact of histocompatibility testing on the success of different transplant programs worldwide is reviewed, in order to show the reasons why transplant procedures are succesful therapeutic approaches in a wide range of different diseases.

BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud. Trasplante de órganos humanos. Informe del Director General. 79a. Reunión Consejo Ejecutivo 3 de diciembre de 1986.
2. Morris, P. J.; Fuggle, S. V.; Ting, A.; *et al.*: HLA and organ transplantation. *Brit. Med. Bull.* 1987; 43(1): 184-202.
3. Pyke, D.: Pancreas transplantation. *Diabetes /Metabolism. Rev.* 1991; 7(1): 3-14.
4. León Rodríguez, E.: Trasplante de médula ósea alogeneico. *Rev. Inv. Clin.* 1993; 45: 77-84.
5. Bach, F. H. and Sachs, D. H.: Transplantation Immunology. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317(8): 489-92.
6. Krensky, A. M.; Weiss, A.; Crabtree, G.; *et al.*: T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322(8): 51 0-17.
7. Halloran, P. F.; Broski, A. P.; Batiuk, T. D. *et al.*: The molecular immunology of acute rejection. *Transplant Immunology.* 1993; 1:3-27.
8. Rosenberg, A. S. and Singer, A.: Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model for immune-mediated tissue destruction. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10: 333-358.
9. Perreault, C.; Décarv, F.; Brochu, S.; *et al.*: Minor histocompatibility antigens. *Blood.* 1990; 76(7): 1269-1280.
10. De Bueger, M. and Goulmy, E.: Human minor histocompatibility antigens. *Transplant Immunology.* 1993; 1: 28-38.
11. Gorga, J. C.: Structural analysis of class II major histocompatibility complex proteins. *Critical Review in Immunology.* 1992; 11(5): 305-335.
12. Wood Schindler, L.: Understanding the Immune System. NIH Publication No. 92-529; 1993, p. 1-40.
13. Dyer, P. A.: Class I and class II loci of the human major histocompatibility complex. *Bailliere's Clinical Rheumatology.* 1988; 2(3): 529-546.
14. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Standards for histocompatibility testing. *ASHI QUATERLY* 1991; 14(1): 122-128.
15. Nagy, M.; Mayr, W. R. and Menzel, G. R.: HLA-DR: serology versus restriction fragment length polymorphism. *Vox Sang.* 1991; 16: 59-61.
16. Tiercy, J. M.; Goumaz, C.; Mach, B.; *et al.*: Application of HLA-DR oligotyping to 110 kidney transplant patients with doubtful serological typing. *Transplantation.* 1991; 51(5): 1110-14.

17. Bidwell, J.: DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today*. 1988; 9(1): 1823.
18. Verduyn, W.; Doxiadis, I. I. N.; Anholts, J.; *et al.*: Biotinylated DRB sequence-specific oligonucleotides. Comparison to serologic HLA-DR typing of organ donors in Eurotransplant. *Hum. Immunol.* 1993; 37: 59-67.
19. Santamaría, P.; Lindstrom, A. L.; Boyce Jacino, T.; *et al.*: HLA class I sequencebased typing. *Hum. Immunol.* 1993; 37:39-50.
20. Bein, G.; Glaser, R. and Kirchner, H.: Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens*. 1992, 39: 68-73.
21. Erlich, H. A. and Bugawan, T. L.: HLA DNA typing. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. 1990, pp. 261-271.
22. Angelini, G.; de Préal, C.; Gorski, J.; *et al.*: High resolution analysis of human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence oligonucleotides probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 4489-93.
23. Cros, P.; Allibert, P.; Mandrand, B.; *et al.*: Oligonucleotide genotyping of HLA polymorphism on microtitre plates. *Lancet*. 1992; 340: 870-73.
24. Kaminski, E. R.: How important is histocompatibility in bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplantation*. 1989; 4: 439-444.
25. Van Rood, J. J.: Prospective HLA typing is helpful in cadaveric renal transplantation. *Transplant. Proc.* 1987; 19(1): 139-143.
26. Takiff, H.; Mickey, M. R.; Ciciarelli, J.; *et al.*: Factors important in ten-year kidney graft survival. *Transplant. Proc.* 1987; 19(1): 666-68.
27. So, S. K. S.; Minford, E. J.; Moundry-Munns, K. C.; *et al.*: DR-matching improves cadaveric pancreas transplant results. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 687-88.
28. Sutherland, D. E. R.: International transplant registry 1984-8. *Clin. Transplant*. 1989; 3:129.
29. Todd, J. A.; Bell, J. I. and McDevitt, H. O.: HLA-DQ gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1987; 329: 599-604.
30. Smith, R. A.; Gutendorf, R. W. and McCloskey, J.: Genetic marker analysis in cases of disputed paternity when the alleged father is deceased. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1989; 19(5): 332-336.
31. Strachan, T.: Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Brit. Med. Bull.* 1987; 43(1): 1-14.